

14

POWERED BY **Dialog**

**PNA-synthesis using an aminoprotecting group which is labile against weak acids**  
***PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Sauren labilen Amino-Schutzgruppe***  
***Synthèse de PNA en utilisant un groupe aminoprotecteur labile contre des acides faibles***

**Assignee:**

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, (200263), Bruningstrasse 50, 65929 Frankfurt am Main, (DE), (applicant designated states: AT;BE;CH;DE;DK;ES;FR;GB;GR;IE;IT;LI;LU;NL;PT;SE)

**Inventor:**

Breipohl, Gerhard, Dr., Geisenheimer Strasse 95, D-60529 Frankfurt, (DE)  
 Uhlmann, Eugen, Dr., Zum Talblick 31, D-61479 Glashutten, (DE)

**Patent**

Country Code/Number	Kind	Date
EP 672700	A1	September 20, 1995 (Basic)
EP 672700	B1	June 02, 1999

**Application**

Country Code/Number	Date
EP 95103318	March 08, 1995

**Priority Application Number (Country Code, Number, Date):** DE 4408531 (940314)

**Designated States:** AT; BE; CH; DE; DK; ES; FR; GB; GR; IE; IT; LI; LU; NL; PT; SE

**International Patent Class:** C08G-069/06; C07D-239/54; C07D-239/46; C07D-473/18; C07D-473/34; C08G-069/10

**Abstract:** EP 672700 A1

Es werden Verfahren zur Herstellung von PNA-Oligomeren der Formel (siehe Patentzeichnung im original Dokument)  
 worin B/X wie in der Beschreibung definiert ist, R(sup 0) Wasserstoff, Alkanoyl, Alkoxycarbonyl, Cycloalkanoyl, Aroyl, Heteroaroyl, oder eine Gruppe bedeutet, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt, A und Q jeweils ein Aminosaurerest bedeuten; k und l jeweils eine ganze Zahl von Null bis 10 sind, B für eine in der Nucleotidchemie übliche natürliche Nucleobase oder unnatürliche Nucleobase oder deren Prodrugformen, oder auch für Basenersatzverbindungen steht, Q( hochgestellt(o) Hydroxy oder gegebenenfalls substituiertes NH(sub 2) und n eine ganze Zahl von 1 - 50 ist, beschrieben. Dabei werden die Aminosaurereste und die Bausteine (siehe Patentzeichnung im original Dokument) worin PG für eine gegen schwache Säuren labile Aminoschutzgruppe und B' für eine an der exocyclischen Amino- bzw. Hydroxyfunktion geschützte Nucleobase steht, stufenweise nach der Festphasenmethode auf einen polymeren Träger, der mit einer Ankergruppe versehen ist, aufgekuppelt und nach beendetem Aufbau die Zielverbindungen mittels eines Abspaltungsreagenzes vom polymeren Träger abgespalten. Ferner werden Zwischenprodukte der PNA-Oligomeren sowie Verfahren zu deren Herstellung beschrieben.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 672 700 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **95103318.2**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>: **C08G 69/06, C07D 239/54,  
C07D 239/46, C07D 473/18,  
C07D 473/34, C08G 69/10**

(22) Anmeldetag: **08.03.95**

(30) Priorität: **14.03.94 DE 4408531**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**20.09.95 Patentblatt 95/38**

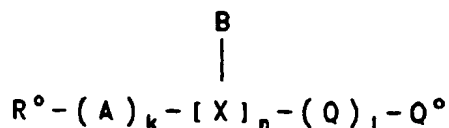
(54) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL  
PT SE**

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
Brüningstrasse 50  
D-65929 Frankfurt am Main (DE)**

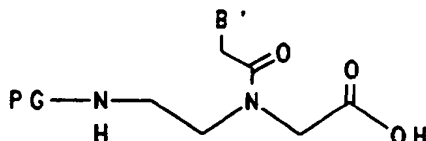
(72) Erfinder: **Breipohl, Gerhard, Dr.  
Geisenheimer Strasse 95  
D-60529 Frankfurt (DE)  
Erfinder: Uhlmann, Eugen, Dr.  
Zum Talblick 31  
D-61479 Glashütten (DE)**

(54) **PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Säuren labilen Amino-Schutzgruppe.**

(57) Es werden Verfahren zur Herstellung von PNA-Oligomeren der Formel



worin B/X wie in der Beschreibung definiert ist, R<sup>0</sup> Wasserstoff, Alkanoyl, Alkoxycarbonyl, Cycloalkanoyl, Aroyl, Heteroaroyl, oder eine Gruppe bedeutet, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt, A und Q jeweils ein Aminosäurerest bedeuten; k und l jeweils eine ganze Zahl von Null bis 10 sind, B für eine in der Nucleotidchemie übliche natürliche Nucleobase oder unnatürliche Nucleobase oder deren Prodrugformen, oder auch für Basenersatzverbindungen steht, Q<sup>0</sup> Hydroxy oder gegebenenfalls substituiertes NH<sub>2</sub> und n eine ganze Zahl von 1 - 50 ist, beschrieben. Dabei werden die Aminosäurereste und die Bausteine

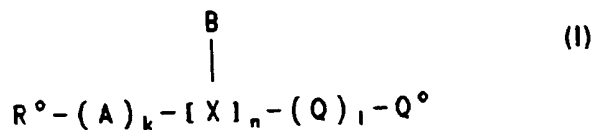


worin PG für eine gegen schwache Säuren labile Aminoschutzgruppe und B' für eine an der exocyclischen Amino- bzw. Hydroxyfunktion geschützte Nucleobase steht, stufenweise nach der Festphasenmethode auf einen polymeren Träger, der mit einer Ankergruppe versehen ist, aufgekuppelt und nach beendetem Aufbau die Zielverbindungen mittels eines Abspaltungsreagenzes vom polymeren Träger abgespalten. Ferner werden Zwischenprodukte der PNA-Oligomeren sowie Verfahren zu deren Herstellung beschrieben.

Peptide bzw. Polyamide Nucleic Acids (PNA) sind DNA-analoge Verbindungen in denen das Deoxyribose-Phosphat-Gerüst durch ein Peptid-Oligomer ersetzt wurde. Die bisher in der Literatur (Michael Egholm, Peter E. Nielsen, Ole Buchardt and Rolf H. Berg, J. Am. Chem. Soc. 1992, 114, 9677-9678; Ole Buchardt, Michael Egholm, Peter E. Nielsen and Rolf H. Berg, WO 92/20702) beschriebenen Synthesen verwenden zum temporären Schutz der Aminogruppe des Monomers die säurelabile tert.-Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe, die durch mittelstarke Säuren, wie z.B. Trifluoressigsäure abgespalten wird. Die Festphasensynthese von Oligomeren folgt dabei dem üblichen Peptidsyntheseverfahren, wie es z.B. von Merrifield (B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149) beschrieben wurde. Die Abspaltung des PNA-Oligomeren vom festen Träger erfolgt dabei mit einer starken Säure, üblicherweise mit flüssigem Fluorwasserstoff. Die wiederholte Behandlung mit Trifluoressigsäure und die anschließende Spaltung mit Fluorwasserstoff ist mit der Synthese von gemischten PNA/DNA-Sequenzen nicht kompatibel, da unter diesen Bedingungen die nucleosidische Bindung nicht stabil ist. Insbesondere werden die Purinnucleotide Desoxyguanosin und Desoxyadenosin mit starken Säuren an der N-glykosidischen Bindung rasch gespalten. Weiterhin wäre für die Synthese von derartigen Molekülen eine Verwendung von den üblichen DNA-Synthesizern und einer weitgehenden Beibehaltung der in diesen Geräten verwendeten Chemie besonders wünschenswert.

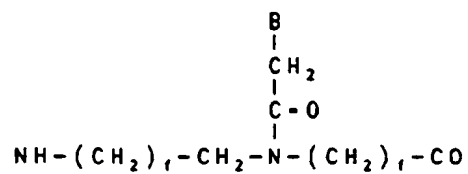
Ziel der Erfindung ist, ein Syntheseverfahren mit einer gegen schwache Säuren labilen temporären Amino-Schutzgruppe für den Aufbau der PNA-Oligomeren zu entwickeln, das eine Abspaltung vom festen Träger unter den üblicherweise für Oligonucleotide verwendeten basischen Verfahren erlaubt.

Die nachfolgende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von PNA-Oligomeren der Formel I

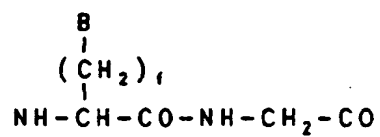


worin  
B/X für

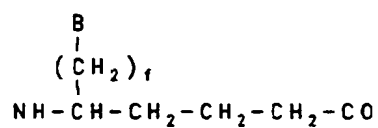
5



10

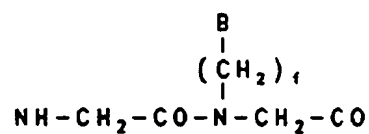


15

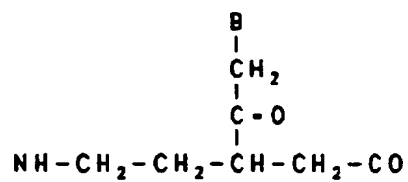


20

25

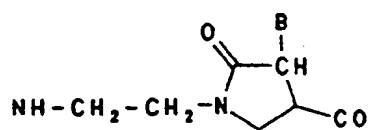


30



35

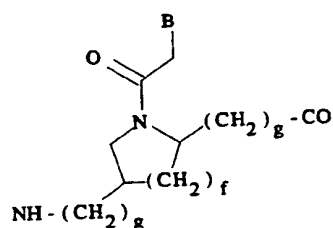
40



45

50

55


$$\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2)_4-\text{CO}$$

$$\begin{array}{c} \text{B} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}-\text{O} \\ | \end{array}$$

L-[Polymer] (II),

4

c) die Schritte a und b (l-1)fach wiederholt.

d) auf die dabei als Zwischenprodukt entstehende Verbindung der Formel III

(Q')<sub>l</sub>-L-[Polymer] (III).

worin L wie oben definiert ist, Q' für eine Aminosäure Q steht, die gegebenenfalls in der Seitenkette geschützt ist, und l für eine ganze Zahl von Null bis 10 steht oder direkt auf den polymeren Träger der Formel II eine Verbindung der Formel IV



worin

PG für eine gegen schwache Säuren labile Aminoschutzgruppe und

B'/X für einen Baustein wie in Formel I definiert steht,

mit einer an der exocyclischen Amino- oder Hydroxyfunktion gegebenenfalls geschützten Nucleobase,

worin

B' für in der Nucleotidchemie übliche Basen, beispielsweise für natürliche Basen wie Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil oder unnatürliche Basen wie Purin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, N<sup>4</sup>N<sup>4</sup>-Ethancytosin, N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, 5-Methylcytosin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyluracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-Fluoruracil oder Pseudoisocytosin, deren exocyclische Amino bzw. Hydroxygruppen gegebenenfalls durch geeignete bekannte Schutzgruppen, wie die Benzoyl-, Isobutanoyl-, Acetyl-, Phenoxycetyl-, 4-(t-Butyl)-benzoyl-, 4-(t-Butyl)-Phenoxycetyl-, 4-(Methoxy)-benzoyl-, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-, Diphenylcarbamoyl oder Formamidin-Gruppe, bevorzugt die Benzoyl-, Isobutanoyl-, 4-(t-Butyl)benzoyl-, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-, und für Guanin durch eine Kombination von 2-N-Acetyl mit der 6-O-Diphenylcarbamoyl-Gruppe, geschützt sind, oder auch für Basenersatzverbindungen, wie z.B. Imidazol, Nitro-Imidazol und Triazol, stehen,

unter Verwendung der in der Peptidchemie üblichen Kupplungsreagenzien aufkuppelt,

e) die temporäre gegen schwache Säuren labile Schutzgruppe PG mittels eines geeigneten Reagenzes abspaltet,

f) die Schritte d und e (n-1)fach wiederholt,

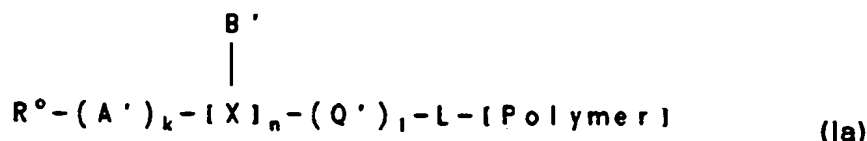
g) mit einem für die Festphasensynthese üblichen Verfahren weitere Aminosäuren (A') aufkuppelt,

h) die gegen schwache Säuren labile Schutzgruppe PG mittels eines geeigneten Reagenzes abspaltet,

i) die Schritte g und h (k-1)fach wiederholt,

j) für den Fall, daß R<sup>0</sup> nicht Wasserstoff ist, den Rest R<sup>0</sup> mit einem üblichen Verfahren einführt,

k) aus der als Zwischenverbindung erhaltenen Verbindung der Formel Ia



worin R<sup>0</sup>, k, B'/X, n, Q', und l wie oben definiert sind, A' für eine Aminosäure A steht, die gegebenenfalls in der Seitenkette geschützt ist, und L für eine Ankergruppe steht,

die Verbindung der Formel I mittels eines Abspaltungsreagenzes vom polymeren Träger abspaltet wobei gleichzeitig oder auch anschließend die an der exocyclischen Amino- bzw. Hydroxyfunktion der Nucleobasen und an den Seitenketten der Aminosäuren gegebenenfalls vorhandenen Schutzgruppen abgespalten werden.

Nachfolgendes Syntheschema für PNA zeigt diesen Reaktionsablauf:

[L]-[Polymer]

↓ a) Aufkupplung von PG-(Q')-OH

PG-(Q')-[L]-[Polymer]

↓ b) Abspaltung der Schutzgruppe PG

H-(Q')-[L]-[Polymer]

↓ c) Wiederholung der Schritte a und b (l-1)-mal

5 H-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

↓ d) Aufkupplung von PG-[B'/X]-OH

PG-[B'/X]-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

↓ e) Abspaltung der Schutzgruppe PG

H-[B'/X]-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

10 ↓ f) Wiederholung der Schritte d und e (n-1)-mal

H-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

↓ g) Aufkupplung von PG-(A')-OH

PG-(A')-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

↓ h) Abspaltung der Schutzgruppe PG

15 H-(A')-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

↓ i) Wiederholung der Schritte g und h (k-1)-mal

H-(A')<sub>k</sub>-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

↓ j) Aufkupplung der Gruppe R<sup>0</sup>

R<sup>0</sup>-(A')<sub>k</sub>-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>l</sub>-[L]-[Polymer]

20 ↓ k) Abspaltung von Polymer und Schutzgruppen

R<sup>0</sup>-(A')<sub>k</sub>-[B/X]<sub>n</sub>-(Q)<sub>l</sub>-Q \*

Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigen sind zum Beispiel Alkanoyl- und Alkoxy-carbonylverbindungen mit verschiedenen lipophilen Resten wie -(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-CH<sub>3</sub>, worin x eine ganze Zahl von 6-18 bedeutet, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH = CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>, worin n und m unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 6 bis 12 bedeuten, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub> und -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>, aber auch Steroid-Reste wie Cholesteryl oder Vitamin-Reste wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin D und andere Konjugate, die natürliche Carriersysteme ausnutzen wie Gallensäure, Folsäure, 2-(N-Alkyl, N-Alkoxy)-Aminoanthrachinon und Konjugate der Mannose und Peptide der entsprechenden Rezeptoren, die zur rezeptorvermittelten Endozytose der Oligomeren führen wie EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin und PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Unter Markierungs-Gruppen sind fluoreszierende Gruppen beispielsweise von Dansyl- (N-Dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), Fluorescein- oder Coumarin-Derivaten oder chemilumineszierende Gruppen beispielsweise von Acridin-Derivaten zu verstehen sowie das über ELISA nachweisbare Digoxigenin-System, die über das Biotin/Avidin-System nachweisbare Biotin-Gruppe oder aber Linker-Arme mit funktionellen Gruppen, die eine nachträgliche Derivatisierung mit nachweisbaren Reporter-Gruppen gestatten, beispielsweise ein Aminoalkyl-Linker, der mit einem Acridinium-Aktivester zur Chemilumineszenz-Probe umgesetzt wird. Typische Markierungsgruppen sind:

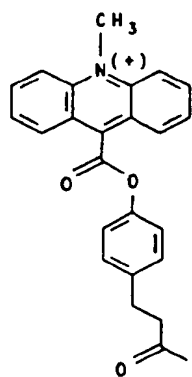
40

45

50

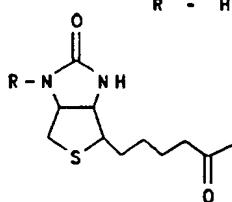
55



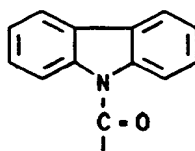


Acridinium-Ester

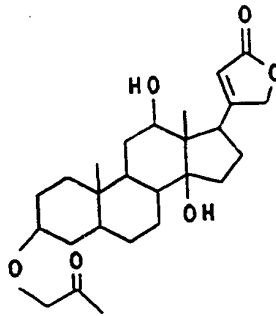
R - H oder Aminoschutzgruppe



Biotinkonjugat (- "Biotin" fuer R - Boc)

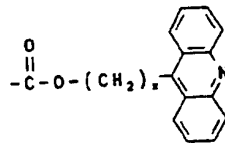


Carbazolderivat

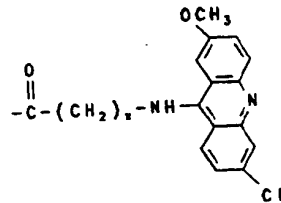


# Digoxigeninkonjugat

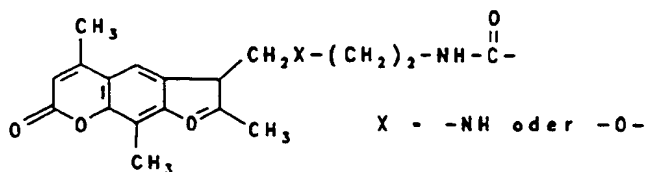
Gruppen, die bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreifen sind zum Beispiel Acridin-, Psoralen-, Phenanthridin, Naphtochinon-, Daunomycin- oder Chlorethylaminoaryl-Konjugate. Typische interkalierende und quervernetzende Reste sind:



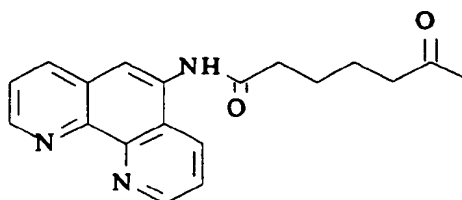
Acridinderivat  $x = 2-12$ , bevorzugt 4



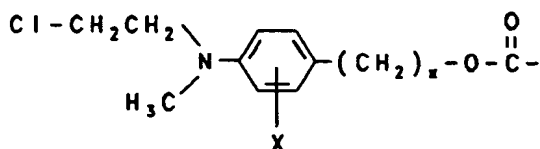
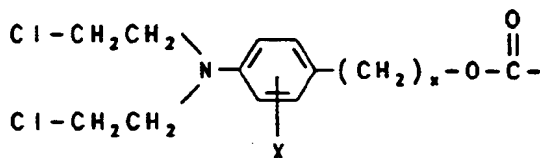
$x = 2-12$ , bevorzugt 4



Trimethylpsoralen-konjugat (= "Psoralen" fuer X = O)



## Phenanthrolinkonjugat


$$x = 1-18, X = \text{Alkyl, Hologen, NO}_2, \text{CN, } \begin{array}{c} \text{-C-R} \\ || \\ \text{O} \end{array}$$


x = 1-18, X = Alkyl, Halogen, NO<sub>2</sub>, CN,  $\begin{array}{c} -C-R \\ || \\ O \end{array}$

Ankergruppen L, die latent die Funktion Q<sup>o</sup> enthalten sind zum Beispiel bei George Barany, Nancy Kneib-Cordonier and Daniel G. Mullen., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1987, 30, 705-739; beschrieben.

Polymere Träger, die mit einer Ankergruppe versehen sind, die latent die Gruppe Q\* enthalten, sind beispielsweise p-Nitrobenzophenonoxim-Polystyrol-Harz (E.T. Kaiser, S.H. Nakagawa, J. Org. Chem. 1983, 48, 678-685), 4-(2-Hydroxyethylsulfonyl)benzoyl-Harz oder die mit einer primären Aminogruppe funktionalisierten polymeren Träger, wie z.B. ®polyHIPE, ®Tentagel, ®Controlled Pore Glass, Polystyrol, auf die eine

der latent die Gruppe Q<sup>+</sup> enthaltende Ankergruppen wie z.B. 4-Hydroxymethylbenzoesäure (E.Atherton, C.J. Logan, R.C. Sheppard, J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1, 538-546 (1981)), 9-Hydroxymethylfluoren-4-carbonsäure (M. Mutter, D. Bellof, Helv. Chim. Acta 67, 2009-2016 (1984)), 4-(2-Hydroxyethylsulfonyl)-benzoesäure (R. Schwyzer, E. Felder, P. Failli, Helv. Chim. Acta 67, 1316-1327 (1984)); (9-(Hydroxymethyl)-2-fluorenyl-essigsäure (Y.Z. Liu, S.H. Ding, J.Y. Chu, A.M. Felix, Int. J. Peptide Protein Res. 35, 95-98 (1990)), N-[9-(Hydroxymethyl)-2-fluorenyl]-bernsteinsäuremonoamid; 4-(2-Hydroxyethyl)-3-nitrobenzoesäure (F. Albericio, E. Giralt, R. Eritja, Tetrahedron Lett. 1991, 1515-1518), Bernsteinsäure-mono(amino-C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>)alkyl)-ester, Oxalsäure-mono(amino-C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>)alkyl)-ester und ähnliche aufgekuppelt sind.

Bevorzugt verwendet werden die folgenden Ankergruppen oder schon an den polymeren Träger

- gebundenen Ankergruppen:  
 10 p-Nitrobenzophenonoxim-Polystyrol-Harz, 4-(2-Hydroxyethylsulfonyl)benzoyl-Harz oder die auf mit einer primären Aminogruppe funktionalisierten Träger vom Typ Tentagel, Controlled Pore Glass, Polystyrol, latent die Gruppe Q<sup>+</sup> enthaltenden gekuppelten Ankergruppen, wie 4-Hydroxymethylbenzoesäure, 4-(2-Hydroxyethylsulfonyl)benzoesäure, N-[9-(Hydroxymethyl)-2-fluorenyl]bernsteinsäuremonoamid, Bernsteinsäure-mono(amino-C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>)alkyl)-ester oder Oxalsäure-mono(amino-C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>)alkyl)-ester.

- 15 Gegen schwache Säuren labile Schutzgruppen PG sind z.B. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl (Adpoc), 1-(3,5-di-tert.-butylphenyl)-1-methylethoxycarbonyl (t-Bumeoc), 1-Methyl-1-(4-biphenyl)-ethyloxycarbonyl (Bpoc), 3,5-Dimethoxyphenyl-2-propyl-2-oxycarbonyl (Ddz) oder vom Trityl-Typ, wie Tri-ethyloxycarbonyl (Bpoc), 3,5-Dimethoxyphenyl-2-propyl-2-oxycarbonyl (Ddz) oder vom Trityl-Typ, wie Tri-methoxyphenylphenylmethyl (Dmt), 9-(9-Phenyl)xanthenyl (Pixyl), besonders bevorzugt werden Schutzgruppen vom Trityl-Typ, wie Trt, Mmt, Dmt verwendet, ganz besonders bevorzugt wird die Mmt-Schutzgruppe verwendet.

- Die in Schritt a des obigen Syntheseverfahrens benutzten in der Peptidsynthese üblichen Aktivierungsmethoden sind z. B. in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band 15/2, Georg Thieme Verlag  
 25 Stuttgart 1974, beschrieben. Weitere Reagenzien wie z.B. BOP (B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin and C. Selve, Tetrahedron Lett. 1975, 1219-1222), PyBOP (J. Coste, D. Le-Nguyen und B. Castro, Tetrahedron Lett. 1990, 205-208), BroP (J. Coste, M.-N. Dufour, A. Pantaloni und B. Castro, Tetrahedron Lett. 1990, 669-672), PyBroP (J. Coste, E. Frerot, P. Jouin und B. Castro, Tetrahedron Lett. 1991, 1967-1970) und Uronium-672), PyBroP (J. Coste, E. Frerot, P. Jouin und B. Castro, Tetrahedron Lett. 1991, 1967-1970) und Uronium-30 574), TBTU, TPTU, TSTU, TNTU (R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth and D. Gillessen, Tetrahedron Letters 1989, 1927-1930), TOTU (EP-A-0 460 446), HATU (L.A. Carpino, J. Am. Chem. Soc. 1993, 115, 4397-4398), HAPyU, TAPyU (A. Ehrlich, S. Rothenmund, M. Brudel, M. Beyermann, L.A. Carpino und M. Bienert, Tetrahedron Lett. 1993, 4781-4784), BOI (K. Akaji, N. Kuriyama, T. Kimura, Y. Fujiwara und Y. Kiso, Tetrahedron Lett. 1992, 3177-3180) oder 2,4,6-Mesitylsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid (MSNT) (B. Blanke-35 4-hydroxythiophendioxid (TDO) (R. Kirstgen, R.C. Sheppard, W. Steglich, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1987, 1870-1871) oder aktivierte Ester (D. Hudson) Peptide Res. 1990, 51-55) sind in den jeweiligen Literaturstellen beschrieben.

- Bevorzugt ist die Verwendung von Carbodiimiden, z.B. Dicyclohexylcarbodiimid oder Diisopropylcarbodiimid. Bevorzugt verwendet werden ebenfalls Phosphonium-Reagenzien, wie z.B. PyBOP oder PyBroP, Uronium-Reagenzien, wie z.B. HBTU, TBTU, TPTU, TSTU, TNTU, TOTU, HATU oder BOI.

- Die Kupplung kann dabei direkt durch Addition von Aminosäurederivat oder PNA-Monomer der Formel IV mit dem Aktivierungsreagenz und gegebenenfalls unter Zusatz von Additiven wie z.B. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970)) oder 3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrobenzotriazin (HOObt) (W. König, R. Geiger, Chem. Ber. 103, 2034 (1970)) zum Harz durchgeführt werden oder aber  
 45 die Voraktivierung des Bausteines als aktivierter Ester kann separat erfolgen und die Lösung der aktivierten Spezies in einem geeigneten Lösungsmittel zum kupplungsfähigen Polymer gegeben werden.

- Als Schutzgruppe für die exocyclische Aminofunktion der geschützten Nucleobase B' werden mit der gegen schwache Säuren labilen Aminoschutzgruppe PG kompatible Schutzgruppen verwendet. Bevorzugt  
 50 werden Schutzgruppen, wie die Benzoyl-, Isobutanoyl-, Acetyl-, Phenoxyacetyl-, 4-(t-Butyl)-benzoyl-, 4-(t-Butyl)-Phenoxyacetyl-, 4-(Methoxy)-benzoyl-, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-, Diphenylcarbamoyl- oder Formamidin-Gruppe verwendet. Insbesondere bevorzugt sind die Benzoyl-, Isobutanoyl-, 4-(t-Butyl)-benzoyl-, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 2-(2,4-Dinitrophenyl)ethyl-oxycarbonyl-, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-, 4-(Methoxy)-benzoyl-  
 55 oder para-(t-Butyl)-Phenoxyacetyl-, para-Nitrophenyl-2-ethyl-oxycarbonyl-Gruppe und für Guanin eine Kombination der 2-N-Acetyl mit der 6-O-Diphenylcarbamoyl-Gruppe.

Abspaltungsreagenzien für die gegen schwache Säuren labile Aminoschutzgruppe PG sind beispielsweise eine Lösung von 1-10% Trifluoressigsäure in Dichlormethan, eine Lösung von 1-10% Trichloressigsäure

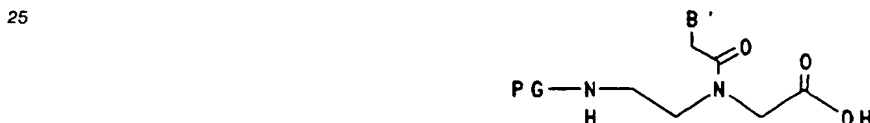
säure in Dichlormethan, eine Lösung von 2-15% Dichloressigsäure in Dichlormethan oder 1-5% p-Toluolsulfonsäure in Dichlormethan. Weiterhin kommen auch Lewis-Säuren, wie beispielsweise Bortrifluorid-etherat oder Zinkbromid in Dichlormethan/Isopropanol in Frage.

Die Aufkupplung der Aminosäurereste Q' bzw. A' der Formel Ia erfolgt mit Aminosäurederivaten, die vorzugsweise die gleiche Aminoschutzgruppe PG tragen, die auch für die Verbindungen der Formel IV verwendet wird. Eventuell vorhandene Seitenkettenfunktionen der Aminosäuren sind mit gegen Basen oder Alkalilauge labilen Schutzgruppen, wie z.B. 9-Fluorenylmethyl (Fm) oder 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) versehen. Bevorzugt sind hierbei Aminosäurederivate wie PG-Gly-OH, PG-Tic-OH, PG-Pro-OH, PG-Phe-OH, PG-Oic-OH, PG-Lys(Fmoc)-OH, PG-Arg(Fmoc)-OH, PG-Cys(Fm)-OH, PG-Asp(OFm)-OH, PG-Glu(OFm)-OH, PG-Aeg(Fmoc)-OH, PG-His(Trt)-OH, worin PG die obige Bedeutung hat. Ganz besonders bevorzugt sind hier die folgenden Aminosäurederivate: Mmt-Gly-OH, Mmt-Tic-OH, Mmt-Pro-OH, Mmt-Phe-OH, Mmt-Oic-OH, Mmt-Lys(Fmoc)-OH, Mmt-Arg(Fmoc)-OH, Mmt-Cys(Fm)-OH, Mmt-Asp(OFm)-OH, Mmt-Glu(OFm)-OH, Mmt-Aeg(Fmoc)-OH, Mmt-His(Fmoc)-OH.

Die Herstellung der bei dem oben beschriebenen Syntheseverfahren eingesetzten Verbindungen der Formel IV



speziell in der Bedeutung



ist in der gleichzeitig eingereichten Patentanmeldung mit dem Titel "PNA-Synthese unter Verwendung einer basenlabilen Amino-Schutzgruppe" (HOE 94/F 059; DE-P 44 08 535.8) beschrieben.

Die oben beschriebenen PNA's werden durch Festphasensynthese an einem geeigneten Trägermaterial (z.B. Polystyrol, mit Polyoxyethylen modifiziertem Polystyrol, wie z.B.  $\text{\textcircled{C}}$ Tentagel,  $\text{\textcircled{C}}$ Controlled Pore Glass), das mit einer Ankergruppe L versehen ist, die latent den Rest Q' enthält, aufgebaut. Die Festphasensynthese beginnt am C-terminalen Ende des PNA mit der Kupplung eines mit einer säurelabilen Schutzgruppe geschützten Monomers oder Aminosäure, die gegebenenfalls in der Seitenkettenfunktion geschützt ist, an ein entsprechendes Harz.

Nach Abspaltung der Schutzgruppe des an das Harz gekuppelten Bausteines mit einem geeigneten Reagenz, wie oben beschrieben, werden die nachfolgenden geschützten Bausteine (PNA-Monomere und Aminosäurederivate) nacheinander in der gewünschten Reihenfolge aufgekuppelt. Die intermediär entstehenden, mit einer säurelabilen Schutzgruppe am N-Terminus geschützten PNA-Harze werden vor der Verknüpfung mit dem nachfolgenden PNA-Monomeren durch die vorbeschriebenen Reagenzien entblockiert.

Die Kupplung bzw. Aktivierung der Aminosäurederivate mit einem der oben genannten Aktivierungsreagenzien kann in Dimethylformamid, N-Methylpyrrolidinon, Acetonitril oder Methylenchlorid oder einer Mischung aus den genannten Lösungsmitteln durchgeführt werden. Die vorgenannten Lösungsmittel können auch zusätzlich mit Hilfsbasen wie z.B. Pyridin, N-Ethylmorpholin oder Triethylamin versetzt werden. Das aktivierte Derivat wird üblicherweise in einem 1,5 bis 10 fachen Überschuß eingesetzt. In Fällen, in denen eine unvollständige Kupplung eintritt, wird die Kupplungsreaktion wiederholt, ohne Entblockierung der Aminogruppe des gerade aufgekuppelten Bausteins durchzuführen.

Verfahren zur Einführung des Restes R<sup>0</sup> sind zum Beispiel für den Fall, daß dieser Rest eine Carbonsäurefunktion enthält, die oben für die Aufkupplung der Aminosäuren und PNA-Monomeren beschriebenen Methoden. Weitere Verfahren sind die Umsetzung von Isocyanaten wie z.B. Phenylisocyanat, Isothiocyanaten wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat, Chlorameisensäurederivaten, wie z.B. Chlorformylcarbazol, Kohlensäureaktivestern wie z.B. Cholesterin-(4-nitrophenyl)carbonat, Acridinium-succinimidylcarbonat, Sulfochloriden wie z.B. Dansylchlorid etc.

Gegebenenfalls können in einem weiteren Schritt der Amino- und Carboxy-Terminus der Verbindungen der Formel I auch miteinander verbunden werden. Diese Verknüpfung erfolgt bevorzugt über eine Amidbindung zwischen den Seitenkettenfunktionen der Aminosäurereste A bzw. Q in der Bedeutung Lys, Glu, Asp, Aeg bzw. durch Herstellung einer Disulfidbrücke zwischen jeweils einer Aminosäure A und Q in der Bedeutung Cys.

Der vorhergehend beschriebene Synthesepfad kann auch mittels kommerziell erhältlicher Synthesepfadautomaten, wie z.B. Peptidsynthesizern, Multiplen Peptidsynthesizern, DNA-Synthesizern unter leichter Modifikation der üblicherweise verwendeten Syntheseprogrammen durchgeführt werden.

Nach Synthese der PNA's in der vorgehend beschriebenen Weise kann das PNA-Oligomer vom Harz mit geeigneten Reagenzien, wie z.B. konzentrierter Ammoniaklösung, Ethylendiamin, Hydrazin, Butylamin, Methylamin oder Ethanolamin abgespalten werden. Je nach Art des verwendeten Linkers und der Art der verwendeten Schutzgruppen werden Oligomer und die weiteren Seitenkettenschutzgruppen der Nucleinbasen simultan abgespalten. Das Abspaltungsreagenz kann dabei auch durch geeignete Lösungsmittel, wie z.B. Acetonitril, Ethanol oder Methanol, verdünnt angewendet werden.

Die Aufreinigung des nach der Abspaltung erhaltenen Roh-Oligomeres erfolgt mit in der Peptid- oder Nucleotidchemie üblichen Verfahren, wie z.B. HPLC, Ionenaustauschchromatographie etc.

Die für Aminosäuren verwendeten Abkürzungen entsprechen dem in der Peptidchemie üblichen drei Buchstaben-Code wie er in Europ. J. Biochem. 138, 9 (1984) beschrieben ist. Weitere verwendete Abkürzungen sind nachfolgend aufgelistet.

20	Aeg	N-(2-Aminoethyl)glycyl, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CO-
	Aeg(A <sup>MeOBz</sup> )	N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N <sup>6</sup> -4-methoxybenzoyl)-adenosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(C <sup>Me</sup> )	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N <sup>4</sup> -benzoyl)-cytosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(C <sup>MeOBz</sup> )	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N <sup>4</sup> -4-methoxybenzoyl)-cytosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(C <sup>tBuBz</sup> )	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N <sup>4</sup> -4-tert.butylbenzoyl)-cytosyl)acetyl)-glycyl
25	Aeg(G <sup>tBu</sup> )	N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N <sup>2</sup> -isobutanoyl)-guanosyl)acetyl)-glycyl
	Aeg(G <sup>Ac 4 Dpc</sup> )	N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N <sup>2</sup> -acetyl-O <sup>4</sup> -diphenylcarbamoyl)guanosyl)glycyl
	Aeg(T)	N-(2-Aminoethyl)-N-((1-thyminy)acetyl)-glycyl
	Bnpeoc	2,2-[Bis(4-nitrophenyl)]-ethoxycarbonyl
	Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
30	BOI	2-(Benzotriazol-1-yl)oxy-1,3-dimethyl-imidazolidinium-hexafluorophosphat
	BOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
	BroP	Brom-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
	BSA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
	But	tert.-Butyl
35	Bz	Benzoyl
	Bzl	Benzyl
	Cl-Z	4-Chlor-benzyloxycarbonyl
	CPG	Controlled Pore Glas
	DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
40	DCM	Dichlormethan
	Ddz	3,5-Dimethoxyphenyl-2-propyl-2-oxycarbonyl
	DMF	Dimethylformamid
	Dmt	Di-(4-methoxyphenyl)phenylmethyl,
	Dnpeoc	2-(2,4-Dinitrophenyl)-ethoxycarbonyl
45	Dpc	Diphenylcarbamoyl
	FAM	Fluorescein-Rest
	Fm	9-Fluorenylmethyl
	Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
	H-Aeg-OH	N-(2-Aminoethyl)glycin
50	HAPyU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tetramethylen)uronium-hexafluorophosphat
	HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
	HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
	HONSu	N-Hydroxysuccinimid
55	HOObt	3-Hydroxy-4-oxo-3,4-dihydrobenzotriazin
	iBu	Isobutanoyl
	MeOBz	4-Methoxybenzoyl
	Mmt	4-Methoxytriphenylmethyl

	Moz	4-Methoxybenzyloxycarbonyl
	MSNT	2,4,6-Mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid
	Mtt	4-Methylphenyl)diphenylmethyl
	NBA	Nitrobenzylalkohol
5	NMP	N-Methylpyrrolidin
	Pixyl	9-(9-Phenyl)xanthenyl
	PyBOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
	PyBroP	Brom-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
	TAPipU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(pentamethylen)uronium-tetrafluoroborat
10	TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	tBu	tert.-Butyl
	tBuBz	4-tert. Butylbenzoyl
	TDBTU	O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
15	TDO	2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid
	TFA	Trifluoressigsäure
	THF	Tetrahydrofuran
	TNTU	O-[(5-Norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	TOTU	O-[(Cyano(ethoxycarbonyl)methylen)amino]-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
20	TPTU	O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-1,1,3,3'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	Trt	Trityl
	TSTU	O-(N-Succinimidyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	Z	Benzyloxycarbonyl
25	MS(ES <sup>+</sup> )	Elektrospray Massenspektrum (Positiv Ion)
	MS(ES <sup>-</sup> )	Elektrospray Massenspektrum (Negativ Ion)
	MS(DCI)	Desorption Chemical Ionisation Massenspektrum
	MS(FAB)	Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrum

Die folgenden Beispiele sollen die bevorzugten Methoden zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen verdeutlichen, ohne daß die Erfindung darauf eingeschränkt wäre.

#### Synthese der Peptide Nucleic Acids

Die Synthese der PNA's erfolgt beispielsweise an einem Ecosyn D-300 DNA Synthesizer (Fa. Eppendorf/Biotronik, Maintal) oder einem ABI 380B DNA Synthesizer (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt). Eine Beschreibung der Synthese-Zyklen ist nachfolgend ausgeführt.

Die Synthese erfolgt in Standard-DNA-Synthese-Säulen der Firma Applied Biosystems, die mit Mmt-hex-succ-Tentagel oder Mmt-hex-succ-CPG befüllt sind. Es werden Säulen für Synthesen im 3 µMol oder 6 µMol Maßstab verwendet. Als Reagenz zur Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe wird 3% Trichloressigsäure in Dichlormethan verwendet. Nach Waschen des Trägers mit Acetonitril erfolgt eine Neutralisation mit einer 3.5 M Lösung von 4-Ethylmorpholin in Acetonitril. Zur Kupplung wird eine Mischung bestehend aus einer 0.3 bzw. 0.4 M Lösung der Mmt-Aeg-Derivate in Acetonitril/DMF, DMF/NMP mit 1 % Triton X-100, DMF mit N-Ethylmorpholin, DMF mit Pyridin, einer 0.9 M Lösung von PyBOP in Acetonitril und einer 3.5 M Lösung von 4-Ethylmorpholin in Acetonitril oder einer 0.3 M Lösung von HATU in DMF mit einer 0.3 M Lösung von NEM in DMF in die Synthesesäule eingebracht. Nachfolgendes Capping erfolgt mit einer 1:1 Mischung der Standard DNA-Synthese Capping-Reagenzien (Acetanhydrid/Lutidin/N-Methylimidazol-Lösung in THF). Das PNA wird durch Behandlung mit konzentrierter Ammoniak-Lösung am Synthesizer vom Träger abgespalten, wobei zur Entfernung der Basen-Schutzgruppen die vereinigten ammoniakalischen Lösungen in einer verschlossenen Ampulle für 5h auf 55 °C erwärmt werden. Danach erfolgt gegebenenfalls die Abspaltung der aminoterminalen Mmt-Gruppe mit 80% Essigsäure bei Raumtemperatur.

Die PNA's werden an einem Beckman System Gold HPLC Gerät über eine Dionex Nucleopac PA-100 (4x250mm)-Säule mit einem linearen Gradienten von 0-0.75M NaCl in 20mM NaOH analysiert.

Die Reinigung erfolgt an einer Pharmacia Biopilot FPLC-Anlage mit einer Pharmacia Mono Q HR 10/10-Säule mit einem linearen Gradienten von 0-0.5M NaCl in 20mM NaOH als Elutionsmittel. Die Entsalzung der gereinigten PNA's gelingt mit Hilfe einer BondElut-C18-Säule (Fa. Analytichem Int'l) oder über Biogel (Fa. Biorad).

## Beispiel 1

1-Hydroxy-6-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hexan  
(Mmt-hex)

- 5 6-Aminohexan-1-ol (1g; 8.55mmol) wird in wasserfreiem Pyridin (7ml) gelöst und mit Triethylamin (0.2ml) versetzt. Zu dieser Lösung gibt man innerhalb von 45 Minuten eine Lösung von (4-Methoxyphenyl)-diphenylmethyl chlorid (2.5g; 8.12mmol) in wasserfreiem Pyridin (9ml). Die Reaktionslösung wird 30 Minuten bei 22 °C weitergerührt und durch Zugabe von Methanol (3ml) gestoppt. Die Lösung wird am  
10 Rotationsverdampfer eingeeengt, der erhaltene Rückstand zur Entfernung des Pyridins dreimal mit Toluol koevaporiert. Der erhaltene Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und diese Lösung nacheinander mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung, mit Wasser und einer gesättigten Kaliumchloridlösung gewaschen. Nachdem die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet wurde, filtriert man und konzentriert die Lösung im Vakuum. Das Rohprodukt läßt sich durch Kieselgelchromatographie mit Heptan:Ethylacetat:Triethylamin/  
15 49.5:49.5:1 reinigen.  
Ausbeute: 1.64g  
MS (FAB,NBA/LiCl) 396.3 (M + Li)<sup>+</sup>, 390.3 (M + H)<sup>+</sup>, 273.2 (MMT)<sup>+</sup> R<sub>f</sub> 0.44 (Heptan:Ethylacetat = 1:1),

## Beispiel 2

- 20 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat  
(Mmt-hex-succ)

- 25 1-Hydroxy-6-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hexan (1.00g; 2.57mmol) werden in wasserfreiem Pyridin (10ml) gelöst. Zu dieser Lösung gibt man Bernsteinsäureanhydrid (0.257g; 2.57mmol) and 4-Dimethylaminopyridin (31.3mg; 0.257mmol). Nach 3 Stunden Rühren bei 22 °C gibt man weiteres Bernsteinsäureanhydrid (25.7mg; 0.257mmol) and 4,4-Dimethylaminopyridin (62.6mg; 0.56mmol) zu und erwärmt diese Lösung 6 Stunden lang auf 50 °C. Nach weiteren 16 Stunden bei 22 °C wird eingeeengt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und die erhaltene Lösung mit eiskalter 5%-iger wässriger  
30 Zitronensäure gewaschen. Nach Trocknen der org. Phase (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung des Rückstands durch Kieselgelchromatographie mit 50% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/1% Triethylamin in Ethylacetat und dann mit 5% Methanol/1% Triethylamin in Dichlormethan ergibt die gewünschte Verbindung in Form eines farblosen Öls.  
MS (ES<sup>-</sup>) 978.0 (2M-H)<sup>-</sup>, 488.3 (M-H)<sup>-</sup>  
35 R<sub>f</sub> 0.30 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EthylAcetat = 1:1).

## Beispiel 3

- 40 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl succinylamido-Tentagel  
(Mmt-hex-succ-Tentagel)

- Die Aminoform von Tentagel<sup>R</sup> (Rapp Polymere)(0.5g; 0.11 mmol Aminogruppen) läßt man 10 Minuten in 4-Ethylmorpholin (0.1 ml) und DMF (5ml) quellen. Dann gibt man eine Lösung von 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat (97.4mg; 0.165mmol), 4-Ethylmorpholine (15.9mg; 0.138mmol;  
45 17.4ml) und TBTU (52.9mg; 0.165mmol) in DMF (3ml) zu und schüttelt die Suspension 16 Stunden lang bei 22 °C. Der derivatisierte Tentagelträger wird abfiltriert und nacheinander mit DMF (3x3ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x1ml) and Diethylether (3x1ml) gewaschen und getrocknet. Nicht reagierte Aminofunktionen werden durch 1-stündige Behandlung mit Acetanhydrid/Lutidin/1-Methylimidazol in THF (1ml) blockiert. Der fertige Träger wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x1ml) und Diethylether (3x1ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung  
50 bezogen auf die eingeführte Monomethoxytritylfunktion beträgt 168 µmolg<sup>-1</sup>.

## Beispiel 4

- 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl succinylamidopropyl-Controlled-pore glass.  
55 (Mmt-hex-succ-CPG)

Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 3 beschrieben ausgehend von Aminopropyl-CPG (Firma Fluka) (550Å; 1.0g;) und 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat (48.7mg;



0.082mmol), 4-Ethylmorpholine (7.6ml) und TBTU (26.4mg; 0.082mmol) in DMF (3ml). Die Beladung des MMT-hex-succCPG beträgt 91  $\mu\text{molg}^{-1}$ .

#### Beispiel 5

5

H-[Aeg(T)]<sub>3</sub>-(hex)

H-[Aeg(T)]<sub>3</sub>-(hex) wird nach oben beschriebenen Syntheseverfahren im 3  $\mu\text{Mol}$  Maßstab an Mmt-Hex-Succ-Tentagel synthetisiert. Als Monomer wird Mmt-Aeg(T)-OH verwendet. Die Rohausbeute beträgt 71 OD<sub>260</sub>. Das von 2 OD aufgenommene Massenspektrum zeigt das gewünschte Produkt bei m/e 915.8 (M + H)<sup>+</sup>, und als Nebenprodukt H-[Aeg(T)]<sub>2</sub>-(hex) bei m/e 650.5.

10

#### Beispiel 6

15 H-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]<sub>2</sub>-(hex)

H-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]<sub>2</sub>-(hex) wird nach oben beschriebenen Syntheseverfahren im 3  $\mu\text{Mol}$  Maßstab an Mmt-Hex-Succ-Tentagel synthetisiert. Als Monomere verwendet man Mmt-Aeg(T)-OH und Mmt-Aeg(C<sup>Bz</sup>)-OH. Die Rohausbeute beträgt 98.6 OD<sub>260</sub>. 35 OD<sub>260</sub> des Rohproduktes werden gereinigt und entsalzt und ergaben 14.5 OD<sub>260</sub> der gewünschten Verbindung. Massenspektrometrische Analyse des gereinigten Produktes zeigt das gewünschte Produkt m/e 1685.0 (M + H)<sup>+</sup> als einzigen Hauptpeak.

20

#### Beispiel 7

25

H-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]<sub>2</sub>-(hex)

H-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(T)]<sub>2</sub>-(hex) wird nach oben beschriebenen Syntheseverfahren im 3  $\mu\text{Mol}$  Maßstab an Mmt-Hex-Succ-Tentagel synthetisiert. Als Monomere verwendet man Mmt-Aeg(T)-OH und Mmt-Aeg(C<sup>tBuBz</sup>)-OH.

30

#### Beispiel 8

35 H-[Aeg(A)]-[Aeg(C)]-[Aeg(A)]-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(A)]-[Aeg(T)]-[Aeg(G)]-[Aeg(G)]-[Aeg(T)]-[Aeg(C)]-[Aeg(G)] (hex)

Die Synthese der PNA's erfolgt mit einem Ecosyn D-300 DNA Synthesizer (Fa. Eppendorf/Biotronik, Maintal) an 130 mg (5  $\mu\text{Mol}$ ) Mmt-Hex-Succ- Aminopropyl-CPG.

Für die Synthese wurden folgende Lösungen eingesetzt:

- |    |                                     |   |
|----|-------------------------------------|---|
| 40 | 1) Aktivator-Lsg.:                  | 0,3molare HATU-Lösung in getrocknetem DMF                         |
|    | 2) Base für Aktivierung:            | 0,3molare Lösung von NEM in getrocknetem DMF                      |
|    | 3) Abspaltung von Mmt               | 3%ige Lösung von Trichloressigsäure in Dichlormethan              |
|    | 4) Neutralisations-Lsg.             | Tetrahydrofuran/Wasser/Pyridin 7:2:1                              |
|    | 5) Mmt-Aeg(T)-OH:                   | 0,3molare Lösung in 0,3molarer Lösung von NEM in getrocknetem DMF |
| 45 | 6) Mmt-Aeg(A <sup>MeOBz</sup> )-OH: | 0,3molare Lösung in 0,3molarer Lösung von NEM in getrocknetem DMF |
|    | 7) Mmt-Aeg(C <sup>MeOBz</sup> )-OH: | 0,3molare Lösung in 0,3molarer Lösung von NEM in getrocknetem DMF |
|    | 8) Mmt-Aeg(G <sup>tBu</sup> )-OH:   | 0,3molare Lösung in 0,3molarer Lösung von NEM in getrocknetem DMF |

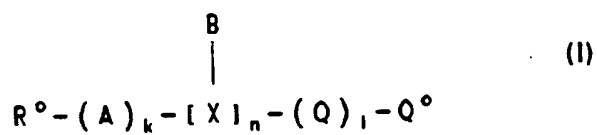
Nach Beendigung der Synthese wird der PNA-CPG-Träger getrocknet und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

50 Ausbeute: 245 OD<sub>260</sub>.

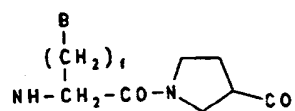
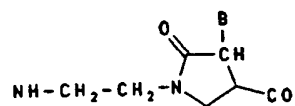
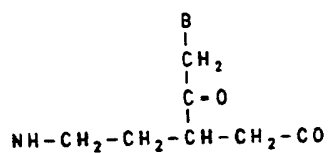
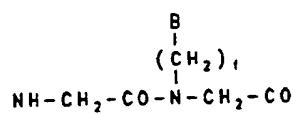
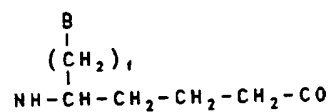
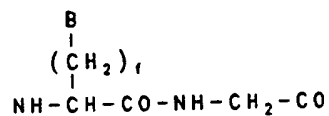
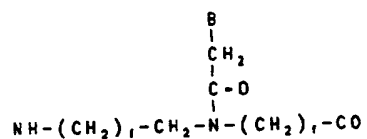
MS 3369.6(ES<sup>+</sup>): (M)<sup>+</sup>

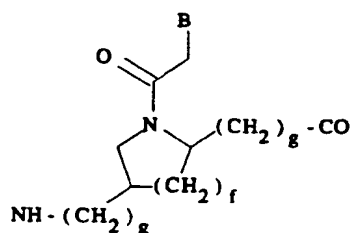
#### Patentansprüche

55 1. Verfahren zur Herstellung von PNA-Oligomeren der Formel I



worin  
B/X für





mit  $f = 1 - 4$  und  $g = \text{Null} - 3$  steht;

$R^\circ$  Wasserstoff,  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkanoyl,  $C_1$ - $C_{18}$ -Alkoxy-carbonyl,  $C_3$ - $C_8$ -Cycloalkanoyl,  $C_7$ - $C_{15}$ -Aroyl,  $C_3$ - $C_{13}$ -Heteroaroyl, oder eine Gruppe bedeutet, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder die bei der Hybridisierung mit der target-Nucleinsäure interagiert;

A ein Aminosäurerest bedeutet;

k eine ganze Zahl von Null bis 10 ist;

Q ein Aminosäurerest bedeutet;

l eine ganze Zahl von Null bis 10 ist;

B für eine in der Nucleotidchemie übliche natürliche Nucleobase oder unnatürliche Nucleobase oder deren Prodrugformen, oder auch für Basenersatzverbindungen steht;

$Q^\circ$  Hydroxy,  $\text{NH}_2$  oder  $\text{NHR}''$  bedeutet mit  $R'' = C_1$ - $C_{18}$ -Alkyl,  $C_2$ - $C_{18}$ -Aminoalkyl oder  $C_2$ - $C_{18}$ -Hydroxyalkyl; und

n eine ganze Zahl von 1 - 50 ist,

dadurch gekennzeichnet, daß man

a) auf einen polymeren Träger der Formel II

L-[Polymer] (II),

der mit einer Ankergruppe L versehen ist, die latent den Rest  $Q^\circ$  enthält entweder zuerst mit einem für die Festphasensynthese üblichen Verfahren Aminosäuren ( $Q'$ ) aufkuppelt,

b) gegebenenfalls die gegen schwache Säuren labile Schutzgruppe PG mittels eines geeigneten Reagenzes abspaltet,

c) die Schritte a und b (l-1)-fach wiederholt,

d) auf die dabei als Zwischenprodukt entstehende Verbindung der Formel III

( $Q'$ )<sub>l</sub>-L-[Polymer] (III),

worin L wie oben definiert ist,  $Q'$  für eine Aminosäure Q steht, die gegebenenfalls in der Seitenkette geschützt ist, und l für eine ganze Zahl von Null bis 10 steht oder direkt auf den polymeren Träger der Formel II eine Verbindung der Formel IV



worin

PG für eine gegen schwache Säuren labile Aminoschutzgruppe und  $\text{B}'/\text{X}$  für einen Baustein wie in Formel I definiert steht,

mit einer an der exocyclischen Aminofunktion gegebenenfalls geschützten Nucleobase, worin

$\text{B}'$  für in der Nucleotidchemie übliche natürliche Basen oder unnatürliche Basen, deren exocyclische Amino bzw. Hydroxygruppen gegebenenfalls durch geeignete bekannte Schutzgruppen geschützt sind, stehen,

unter Verwendung der in der Peptidchemie üblichen Kupplungsreagenzien aufkuppelt,

e) die temporäre gegen schwache Säuren labile Schutzgruppe PG mittels eines geeigneten Reagenzes abspaltet,

f) die Schritte d und e (n-1)-fach wiederholt,

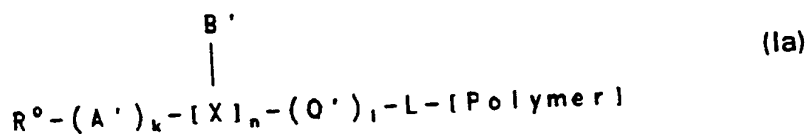
g) mit einem für die Festphasensynthese üblichen Verfahren weitere Aminosäuren ( $A'$ ) aufkuppelt,

h) die gegen schwache Säuren labile Schutzgruppe PG mittels eines geeigneten Reagenzes abspaltet,

i) die Schritte g und h (k-1)fach wiederholt,

j) für den Fall, daß R<sup>0</sup> nicht Wasserstoff ist, den Rest R<sup>0</sup> mit einem üblichen Verfahren einführt,

k) aus der als Zwischenverbindung erhaltenen Verbindung der Formel Ia



worin R<sup>0</sup>, k, B'/X, n, Q', und l wie oben definiert sind, A' für eine Aminosäure A steht, die gegebenenfalls in der Seitenkette geschützt ist, und L für eine Ankergruppe steht, die Verbindung der Formel I mittels eines Abspaltungsreagenzes vom polymeren Träger abspaltet wobei gleichzeitig oder auch anschließend die an der exocyclischen Amino- bzw. Hydroxyfunktion der Nucleobasen und an den Seitenketten der Aminosäuren gegebenenfalls vorhandenen Schutzgruppen abgespalten werden.

2. Verfahren zur Herstellung von PNA-Oligomeren der Formel I gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

A ein Aminosäurerest aus der Reihe Glycin, Leucin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure, Octahydroindol-2-carbonsäure und N-(2-Aminoethyl)glycin bedeutet;

k eine ganze Zahl von Null bis 6 ist;

Q ein Aminosäurerest aus der Reihe Glycin, Leucin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure, Octahydroindol-2-carbonsäure und N-(2-Aminoethyl)glycin bedeutet;

l eine ganze Zahl von Null bis 6 ist;

B für eine natürliche Nucleobase wie Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin und Uracil oder eine unnatürliche Nucleobase wie Purin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, N<sup>4</sup>N<sup>6</sup>-Ethanocytosin, N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, 5-Methylcytosin, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-Fluor-uracil oder Pseudoisocytosin, 2-Hydroxy-5-methyl-4-triazolopyrimidin oder deren Prodrugformen, oder für Imidazol, Nitro-Imidazol oder Triazol steht; und

n eine ganze Zahl von 4 - 35 ist.



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 95 10 3318

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A	WO-A-93 12129 (GLAXO INC.) *Seite 40-43: Ansprüche* ---	1,2	C08G69/06 C07D239/54 C07D239/46
A	ANGEWANDTE CHEMIE, Bd.31, Nr.8, 8. August 1992 Seiten 1008 - 1010 CHRIS MEIER ET AL *Insgesamt* ---	1,2	C07D473/18 C07D473/34 C08G69/10
A	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd.114, Nr.5, 26. Februar 1992 Seiten 1895 - 1897 MICHAEL EGHOLM ETAL *Insgesamt* ---	1,2	
D,A	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd.114, Nr.24, 18. November 1992 Seiten 9677 - 9678 MICHAEL EGHOLM ET AL *Insgesamt* ---	1,2	
D,A	WO-A-92 20702 (BUCHARDT ,OLE ET AL) *Seite 145-156: Ansprüche* ---	1,2	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) C08G C07D
P,A	THE JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, Bd.59, Nr.19, 23. September 1994 Seiten 5767 - 5773 KIM L. DUEHOLM ET AL *Insgesamt* -----	1,2	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche		Prüfer
DEN HAAG	6. Juni 1995		Luyten, H
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- Δ : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1500 02.92 (PAXC01)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**